



Aktivitas Antioksidan Ekstrak Limbah Kulit Ari Biji Kopi (*Coffea sp*) Berdasarkan Tingkat Kepolaran Pelarut

The Atioxidant Activity Of Husk Coffea (*Coffea sp*) Extract Base On Various Levels Of Polar Solvent

Agriyani Marcelinda^{*)}, Ahmad Ridhay, Prismawirianti

Jurusan Kimia Fakultas MIPA, Universitas Tadulako

ABSTRACT

This research was about antioxidant activity of husk of coffee extract based on various levels of polar solvent. This research was conducted by extraction used methanol as solvent in preliminary step, following by fractination using n-hexane, ethyl acetate and butyl alcohol. Those Fractination product then was tested on its antioxidant activity based on DPPH method. The obtained results showed that antioxidant activity of extracts of n-hexane, ethyl acetate, butyl alcohol and vitamin C were 1182.02 ppm, 823.52 ppm, 556.67 ppm and 101.85 ppm.

Keywords : *Husk Coffea, Extraction, Fractination, Antioxidant.*

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang aktivitas antioksidan ekstrak kulit ari biji kopi (*Coffea sp*) berdasarkan tingkat kepolaran pelarut. Penelitian ini diawali dengan melakukan ekstraksi menggunakan pelarut metanol, selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol. Ekstrak hasil fraksinasi dengan *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH. Hasil yang diperoleh untuk aktivitas antioksidan (IC₅₀) pada ekstrak *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol dan vitamin C masing – masing adalah 1182,2 ppm, 823,52 ppm, 556,67 ppm dan 101,85 ppm.

Kata Kunci : *Kulit ari biji kopi, Ekstraksi, Fraksinasi, Antioksidan.*

^{*)}Corresponding Author : agriyanimarcelinda@yahoo.com

LATAR BELAKANG

Kopi memiliki nama latin *Coffea sp.* Buah kopi terdiri atas 4 bagian yaitu lapisan kulit luar (*exocarp*), daging buah (*mesocarp*), kulit tanduk (*parchment*), dan biji (*endosperm*). Indonesia menempati urutan keempat sebagai penghasil kopi terbanyak di dunia dengan produksi mencapai 29,3 ton pada tahun 2012 (BPS RI, 2012). Berdasarkan data Badan Statistik perkebunan pada tahun 2013, Sulawesi Tengah merupakan salah satu daerah di Indonesia yang memiliki tingkat produksi kopi yang cukup banyak. Pada tahun 2012 produksi kopi dari perkebunan rakyat yaitu sebanyak 4.626 ton dengan penggunaan lahan tanam sebesar 7.573 Ha.

Pada proses pengolahan kopi dihasilkan limbah sebanyak 40-45% limbah kulit biji kopi. Menurut Esquivel dan Jimenez (2012), yang dikatakan limbah kulit kopi adalah *pulp* (bagian mesokarp), *skin* (bagian eksokarp), *mucilage* dan *parchment* (bagian endokarp). Kulit ari biji kopi adalah salah satu bagian dari limbah biji kopi yang dihasilkan pada proses pengolahan biji kopi.

Pada umumnya, limbah kulit ari biji kopi hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Kurangnya kepedulian masyarakat dan minimnya informasi tentang manfaat penggunaan limbah kulit

ari biji kopi menjadi penyebab tidak adanya pemanfaatan dan pengolahan dari limbah kulit biji kopi tersebut. Salah satu manfaat penting dari limbah kulit ari biji kopi adalah peranannya sebagai antioksidan alami.

Limbah kulit biji kopi ini juga mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yaitu kafein dan golongan polifenol. Dari beberapa penelitian, senyawa polifenol yang ada pada limbah ini adalah flavan-3-ol, asam hidroksinamat, flavonol, antosianidin, katekin, epikatekin, rutin, tanin, asam ferulat (Esquivel dan Jimenez 2012).

Ekstraksi dengan pelarut didasarkan pada sifat kepolaran zat dalam pelarut saat ekstraksi. Senyawa polar hanya akan larut pada polar, seperti metanol, etanol, butanol dan air. Senyawa non polar hanya akan larut pada pelarut non polar, seperti kloroform dan heksana (Gritter *et.al.*, 1991). Jenis dan mutu pelarut yang digunakan menentukan keberhasilan proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan harus dapat melarutkan zat yang diinginkan, mempunyai titik didih yang rendah, murah, tidak toksik dan tidak mudah terbakar (Harborne, 1987). Melalui artikel ini diinformasikan mengenai aktivitas antioksidan ekstrak limbah kulit ari biji kopi (*Coffea sp*) berdasarkan tingkat kepolaran pelarut.

BAHAN DAN METODE

Bahan dasar yang digunakan dalam penelitian ini limbah kulit ari biji kopi yang diperoleh dari Pabrik (*Coffea canephora*). Bahan – bahan lain yang diperlukan yaitu metanol teknis (CV. Intraco, Makassar) *n*-heksan (CV. Intraco, Makassar), etil asetat (CV. Intraco, Makassar), *n*-butanol (CV. Intraco Makassar), akuades, aluminum foil, kertas saring, vitamin C (Merek IPI), DPPH (Merck).), serbuk Mg, HCl pekat (Merck), FeCl₃ (Merck), kloroform (Merck), anhidrida asam asetat (Merck) dan H₂SO₄ pekat (Merck).

Perlakuan Pendahuluan terhadap bahan

Limbah kulit ari biji kopi ditimbang sebanyak 400 gram. Selanjutnya, dihaluskan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk kulit ari biji kopi.

Ekstraksi Limbah Kulit Ari Biji Kopi

Sebanyak 200 gram serbuk kulit ari biji kopi dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan metanol teknis sebanyak 600 mL sebelum diekstraksi secara maserasi selama 3 x 24 jam. Hasil ekstraksi disaring menggunakan corong *buchner* sehingga didapatkan filtrat yang mengandung metanol dan residu. Filtrat yang diperoleh dipekatkan

menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40⁰ C sehingga diperoleh ekstrak kental metanol. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang beratnya (Mahesa, 2012).

Fraksinasi Ekstrak Menggunakan *n*-Heksan, Etil asetat dan *n*-Butanol

Sebanyak 50 gram ekstrak kental metanol dilarutkan dalam 600 mL akuades lalu dimasukkan ke dalam corong pisah dengan kran tertutup. Sebanyak 200 mL *n*-heksana ditambahkan ke dalam larutan ekstrak dan dikocok sampai homogen. Fraksi *n*-heksana dipisahkan dari fraksi air dengan membuka kran corong pisah dan ditampung dalam erlenmeyer. Perlakuan diulang sebanyak 2 kali dengan pelarut yang sama. Fraksi *n*-heksana diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak *n*-heksana. Fraksi sisa air dari *n*-heksana ditambahkan dengan pelarut etil asetat sebanyak 200 mL. Proses yang dilakukan sama seperti pada fraksi *n*-heksana, sehingga diperoleh ekstrak etil asetat. Setelah itu, dilanjutkan dengan menambahkan sebanyak 200 mL *n*-butanol kedalam fraksi sisa air dari etil asetat, sehingga dihasilkan ekstrak *n*-butanol dan fraksi sisa air. Ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan *n*-butanol yang diperoleh kemudian diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH pada panjang gelombang

517 nm dengan spektrofotometri UV-Vis (Rahmadani, 2013).

Uji Golongan Senyawa

a. Uji Flavonoid (Harborne, 1987)

Sebanyak 1 ml sampel ditambahkan 0,5 gram serbuk magnesium dan 10 tetes HCl pekat (pereaksi shinoda), bila bereaksi positif akan menghasilkan larutan berwarna jingga, merah muda atau merah.

b. Uji Polifenol dan Tanin (Harborne, 1987)

Untuk uji polifenol, sebanyak 1 ml sampel ditambahkan 10 tetes larutan FeCl_3 1% bila bereaksi positif akan menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat.

c. Uji Alkaloid (Harborne, 1984)

Ke dalam 1 ml sampel ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Dragendorff, bila bereaksi positif akan menghasilkan endapan merah jingga.

d. Uji Steroid (Harborne, 1984)

Ke dalam 1 ml sampel ditambahkan 2-3 tetes kloroform lalu ditambahkan anhidrida asam asetat dan 5 tetes asam sulfat pekat, bila bereaksi positif akan menghasilkan larutan berwarna biru atau hijau.

Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Menggunakan Metode DPPH

Ekstrak *n*-heksana etil asetat dan *n*-butanol masing - masing ditimbang sebanyak 25 mg dan dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL kemudian dilarutkan dengan metanol dan dicukupkan volumenya sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran dengan menambahkan metanol sehingga diperoleh sampel dengan konsentrasi (10, 30, 50, 70, dan 90 ppm). Untuk penentuan aktivitas antioksidan masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,2 ml larutan sampel dengan pipet mikro dan dimasukan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3,8 ml larutan DPPH 50 μM . Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap, serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs.Kontrol} - \text{Abs.Sampel}}{\text{Abs.Kontrol}} \times 100$$

Abs. Kontrol = Absorbansi DPPH 50 μM

Abs. Sampel = Absorbansi Sampel Uji

(Pratiwi *et al.*, 2010).

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Ekstraksi Limbah Kulit Ari Biji Kopi

Ekstrak metanol diperoleh dari metode ekstraksi maserasi limbah kulit ari biji kopi dengan pelarut metanol yang diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C. Ekstrak metanol yang diperoleh sebanyak 51,973 gram dan berwarna hitam. Menurut Harborne (1987), alkohol adalah pelarut serba guna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan. Menurut Lenny (2006), pelarut metanol adalah pelarut universal yang dianggap dapat mengikat semua komponen kimia yang terdapat dalam tumbuhan bahan alam baik yang bersifat non polar, semi polar, dan polar. Sehingga dengan menggunakan pelarut metanol pada saat ekstraksi pendahuluan diharapkan dapat menarik banyak komponen senyawa bioaktif dari limbah kulit ari biji kopi yang bersifat non polar, semi polar dan polar.

Berdasarkan penelitian Gunalan *et.al.*, (2012), kopi mengandung tanin (Varietas special A, sedangkan varietas kumbakonam tidak mengandung tanin), alkaloid, flavonoid, kumarin, kuinon, fenol dan minyak atsiri. Proses evaporasi pelarut dilakukan pada suhu 40°C. Pemilihan suhu ini bertujuan untuk menguapkan pelarut dan agar senyawa aktif yang terdapat

dalam fraksi tidak mengalami kerusakan, karena bila menggunakan suhu yang tinggi dikhawatirkan akan merusak kandungan senyawa aktif tersebut.

b. Fraksinasi Ekstrak Menggunakan *n*-Heksan, Etil asetat dan *n*-Butanol

Sebanyak 50 gram ekstrak metanol yang diperoleh kemudian difraksinasi cair – cair sebanyak 3 kali dimulai dengan menggunakan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut non polar, etil asetat sebagai pelarut semi polar dan *n*-butanol sebagai pelarut polar. Adapun tujuan dilakukan fraksinasi berulang sebanyak 3 kali yaitu untuk mengoptimalkan pemisahan sehingga zat yang bersifat non polar akan benar – benar terdistribusi ke pelarut non polar (*n*-heksana) senyawa semi polar akan terdistribusi ke pelarut semi polar (etil asetat) dan senyawa polar akan terdistribusi ke pelarut polar (*n*-butanol). Hasil dari fraksinasi ketiga pelarut ini kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C sehingga diperoleh masing – masing ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol. Menurut Edawati (2012), fraksinasi cair - cair bertingkat bertujuan untuk memisahkan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada limbah kulit ari biji kopi berdasarkan tingkat kepolarannya sehingga proses ikatan antara senyawa terjadi secara

bertahap dan diharapkan seluruh senyawa dapat tertarik sempurna.

c. Uji Golongan Senyawa Ekstrak *n*-Heksana, Etil asetat dan *n*-Butanol

Uji golongan senyawa pada masing – masing ekstrak ditandai dengan adanya perubahan warna sebagai uji positif. Masing – masing ekstrak menunjukkan hasil yang berbeda dari setiap tahap pengujian. Pada ekstrak *n*-heksana diketahui positif teridentifikasi steroid, sedangkan untuk ekstrak etil asetat dan *n*-butanol diketahui positif teridentifikasi tanin dan alkaloid (Tabel 1). Pengujian, golongan senyawa ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit apa saja yang terdapat pada limbah kulit ari biji kopi dan hanya difokuskan untuk ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol sehingga terhadap fraksi air tidak dilakukan.

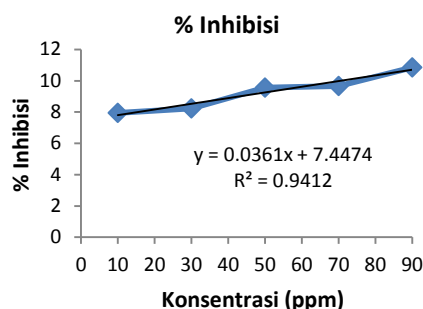
Tabel 1. Hasil Uji Golongan Senyawa

Ekstrak	Flavonoid	Polifenol / Tanin	Alkaloid	Steroid
<i>n</i> -Heksan	-	-	-	+
Etil Asetat	-	+	+	-
<i>n</i> -Butanol	-	+	+	-

Menurut Harbourne (1984), golongan triterpenoid/ steroid merupakan senyawa yang larut dalam pelarut non polar seperti *n*-heksana golongan alkaloid termasuk senyawa semi polar yang dapat larut dalam pelarut semi polar, sedangkan senyawa flavonoid dan tanin dapat larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol, atau pelarut polar lainnya. Tanin termasuk golongan polifenol yang terbagi menjadi dua golongan, yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Menurut Santi *et al.*, (2008), tanin terhidrolisis akan menunjukkan warna biru kehitaman sedangkan tanin terkondensasi akan menunjukkan warna hijau kehitaman ketika penambahan FeCl₃. Hasil uji tanin berwarna hijau kehitaman menunjukkan tanin pada limbah kulit ari biji kopi merupakan tanin terkondensasi yang bersifat polar.

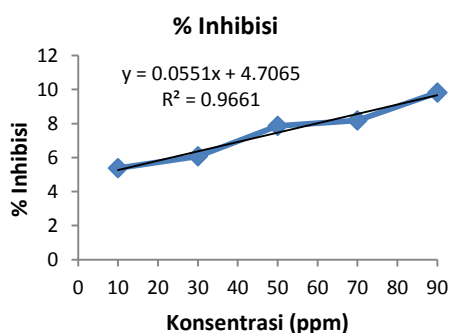
d. Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan kulit ari biji kopi dilakukan melalui penentuan % inhibisi ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan *n*-butanol pada masing – masing konsentrasi yaitu 10 ppm ; 30 ppm ; 50 ppm ; 70 ppm dan 90 ppm.



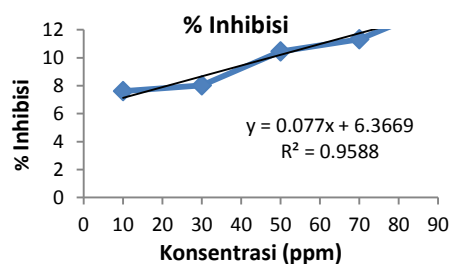
Gambar 1. Hubungan Konsentrasi (ppm) Ekstrak *n*-Heksana dengan Persentase Inhibisi (%).

Berdasarkan gambar 1 diketahui persamaan linear $Y = 0,0361x + 7,4474$ dengan konsentrasi (ppm) sebagai absis (X) dan nilai persentase inhibisi sebagai ordinat (Y), nilai IC_{50} dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50% untuk pelarut *n*-heksana adalah 1182,02 ppm.



Gambar 2. Hubungan Konsentrasi (ppm) Ekstrak Etil Asetat dengan Persentase Inhibisi (%).

Berdasarkan gambar 2 diketahui nilai IC_{50} untuk pelarut etil asetat adalah 823,52 ppm.



Gambar 3. Hubungan Konsentrasi (ppm) Ekstrak *n*-Butanol dengan Persentase Inhibisi (%).

Berdasarkan gambar 3 diketahui nilai IC_{50} untuk pelarut *n*-butanol adalah 823,52 ppm.

Ketiga gambar memperlihatkan bahwa semakin tinggi nilai konsentrasi ekstrak sampel maka semakin tinggi pula nilai peredaman (penghambatan) terhadap aktivitas radikal bebas (% Inhibisi). Peredaman terhadap radikal bebas akan semakin bertambah jika konsentrasi ekstrak sampel bertambah pula. Dengan kata lain bahwa konsentrasi yang tinggi menunjukkan adanya peningkatan aktivitas antioksidan atau peningkatan penghambatan radikal bebas.

Nilai IC_{50} secara berturut – turut untuk pelarut *n*-heksan, etil asetat dan *n*-butanol adalah : 1182,02 ppm ; 823,52 ppm dan 566,67 ppm. Nilai IC_{50} dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50% pada gambar 2 adalah $Y = 0,0551x + 4,7065$. Sedangkan pada gambar 3 diperoleh persamaan $Y = 0,077x + 6,3669$.

Perbandingan nilai IC_{50} pada ketiga jenis pelarut yang berbeda-beda menurut

tingkat kepolarannya menunjukkan bahwa pelarut *n*-butanol memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (karena memiliki nilai IC_{50} yang kecil) jika dibandingkan dengan pelarut *n*-heksan serta etil asetat. Hal ini diduga karena didalam sampel kulit ari biji kopi banyak terdapat senyawa bioaktif yang bersifat polar jika dibandingkan dengan senyawa bioaktif yang bersifat nonpolar dan semipolar sehingga pelarut polar (*n*-butanol) lebih banyak menarik komponen bioaktif yang ada pada kulit ari biji kopi tersebut. Polifenol adalah salah satu kelompok senyawa aktif yang banyak terkandung dalam kulit kopi (Esquivel dan Jimenez 2012).

Tabel. 2 Persen (%) Vitamin C

Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi
2	5,008
3	5,453
4	6,121
5	6,547
6	6,714

Adapun sebagai pembanding, dilakukan pengujian aktivitas antioksidan terhadap vitamin C dengan masing – masing konsentrasi 2, 3, 4, 5 dan 6 ppm. Persen (%) inhibisi tertinggi untuk asam askorbat adalah 6,714 pada konsentrasi 6 ppm dan aktivitas antioksidan (IC_{50}) pada asam askorbat adalah 101,85 ppm. Hasil

ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan nilai aktivitas antioksidan *n*-butanol (556,67 ppm). Hal ini menandakan bahwa sifat antioksidan kulit ari biji kopi bersifat sangat lemah jika dibandingkan dengan asam askorbat. Besarnya persen peredaman pada asam askorbat menunjukkan bahwa asam askorbat mempunyai kemampuan peredaman radikal yang lebih besar dibandingkan dengan ketiga ekstrak tersebut.

Blois (1985) dalam Molyneux (2004) menyatakan bahwa aktivitas antioksidan dapat dibagi menjadi beberapa kategori yaitu sangat kuat, kuat, sedang dan lemah. Antioksidan sangat kuat memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, antioksidan kuat memiliki nilai IC_{50} berada pada kisaran 50 ppm – 100 ppm, antioksidan sedang memiliki nilai IC_{50} berkisar antara 100 ppm – 150 ppm, antioksidan lemah memiliki kisaran ppm 150 ppm – 200 ppm dan antioksidan sangat lemah memiliki nilai IC_{50} lebih dari 200 ppm. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Hanindy (2015), untuk uji aktivitas antioksidan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan metode DPPH pada pelarut etanol dan air, diperoleh nilai IC_{50} sebesar 140,24 ppm. Hasil penelitian aktivitas antioksidan ekstrak biji kopi robusta tersebut lebih baik jika dibandingkan dengan aktivitas

antioksidan ekstrak kulit ari biji kopi yang diperoleh. Berdasarkan nilai aktivitas antioksidan (IC_{50}) limbah kulit ari biji kopi yang diperoleh untuk ekstrak *n*-heksana (182,02 ppm), etil asetat (823,52 ppm) dan *n*-butanol (556,67 ppm), ketiganya dapat digolongkan dalam kategori antioksidan sangat lemah.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka dapat disimpulkan :

1. Limbah kulit ari biji kopi mengandung senyawa antioksidan yang bersifat polar, semi polar dan non polar.
2. Aktivitas antioksidan (IC_{50}) limbah kulit ari biji kopi untuk ekstrak *n*-heksana etil asetat dan *n*-butanol masing - masing adalah 1182,02 ppm ; 823,52 ppm dan 556,67 ppm.
3. Aktivitas antioksidan (IC_{50}) limbah kulit ari biji kopi pada ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan *n*-butanol bersifat sangat lemah jika dibandingkan dengan aktivitas antioksidan vitamin C.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistik Provinsi Sulawesi Tengah. 2013. *Potensi Kopi Di Sulawesi Tengah* by Indonesian Investment Coordinating Board.
- Badan Pusat Statistik Republik Indonesia. 2012. *Produksi Bulanan Perkebunan*
- Besar, Indonesia (000 Ton), 2012. bpsHQ@bps.go.id. Jakarta.
- Edawati, Z., 2012. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Ascidia Didemnum sp. Dari Kepulauan Seribu dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi Teraktif*. Skripsi. FMIPA UI. Depok.
- Esquivel, P. and Victor M. Jimenez. 2012. Functional Properties Of Coffee and Coffee by Productst. *Food Research International*, 46, 488 – 495.
- Gunalan, G., Mayla., N dan Bhalabaskar, R. 2012. *In vitro Antioxidant Analysis of Selected Coffee Bean Varieties*. Department of Biochemistry, SRM Arts and Science College, Kattankulathur, Kanchipuram District, Tamil Nadu, India.
- Gritter, R. J., J. M. Bobbit, and A. E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Ed 2, terjemahan Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung.
- Hanindy, 2015. *Uji aktivitas antioksidan ekstrak biji kopi robusta (Coffea canephora) dengan metode DPPH*. Skripsi. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Harborne, J.B. 1984. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Penerjemah: Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Terbitan Kedua. Bandung: ITB.
- Harborne J B. 1987. *Metode Fitokimia: penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Ed. II. Diterjemahkan oleh Padmawinata K, Sudiro I. Bandung : ITB.

Lenny, S., 2006. *Senyawa Flavonoid, Fenilpropanoida dan Alkaloida*. Karya Tulis Ilmiah. FMIPA. Universitas Sumatra Utara. Medan.

Maheesa.,MF. 2012. *Esterifikasi Senyawa Polifenol Dari Ekstrak Kulit biji Kopi dengan Asam p-hidroksibenzoat dengan menggunakan katalis $\text{SiO}_2 - \text{H}_2\text{SO}_4$* . Tesis FMIPA Universitas Indonesia 2012.

Molyneux, P. 2004. *The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity*. Songklanakarin J. Sci. Technol. 26 (2): 211-219.

Pratiwi, P., S, Mainy dan C, Bambang. 2010. *Total Fenolat dan Flavonoid dari Ekstrak dan Fraksi Daun Kumis Kucing (Orthosiphon stamineus. B)*. Artikel Penelitian, 140 – 148 Jurusan Kimia MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

Rahmadani, R. 2013. *Kandungan senyawa aktif pada Holothuria coluber asal Perairan Lampung Selatan yang Berpotensi Sebagai Antibakteri dan Antioksidan*. Skripsi. Universitas Padjajaran. Bandung.

Sangi, M., Runtuwene, M.R.J., Simbala, H.E.I. dan Makang, V.M.A. 2008. *Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara*. Chemistry Progress. 1:47-53.